

Title	Development of DNA-binding Synthetic Molecules Toward Selective Gene Regulation and Cell Fate Control(Abstract_要旨)
Author(s)	Taniguchi, Junichi
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2018-03-26
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k20940
Right	学位規則第9条第2項により要約公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

(続紙 1)

京都大学	博 士 (理 学)	氏名	谷口 純一
論文題目	Development of DNA-binding Synthetic Molecules Toward Selective Gene Regulation and Cell Fate Control (DNA 結合性合成化合物による選択的な遺伝子発現制御と細胞の運命制御の検討)		
(論文内容の要旨)			
序論			
<p>遺伝情報は配列としてDNAに保存されており、様々な生命活動は遺伝子の適切な発現調節により成り立っている。細胞内で任意のDNA配列を標的とし遺伝子発現を制御できる技術は、細胞の運命制御を可能にするツールとして有効であると考えられる。この目的のため、配列選択的にDNAへ結合するプラットフォームとしてCRISPR/Cas9などのタンパク質、またピロール-イミダゾールポリアミド (PIP) のような合成化合物が開発・研究されてきた。</p>			
1. Distinct DNA-based epigenetic switches trigger transcriptional activation of silent genes in human dermal fibroblasts			
<p>ヒストンのアセチル化修飾は遺伝子発現の活性化状態と相関する。SAHAなどのヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤は、間接的にヒストンのアセチル化を誘導するため、遺伝子発現を活性化させるための薬剤になりうる。DNA配列選択的に遺伝子発現を活性化する分子として、杉山らはSAHAとPIPを結合させた化合物SAHA-PIPを報告した。異なる配列選択性を持つ32種のSAHA-PIPが合成され、多能性関連遺伝子などを活性化するSAHA-PIPが同定されたが、その他のSAHA-PIPの機能は未知であった。そこで申請者はこれらのSAHA-PIPが細胞の遺伝子発現へ与える影響を調べた。</p> <p>繊維芽細胞にSAHA-PIPを処理し、マイクロアレイによる網羅的発現解析を行った。32種のうち26種において、100以上の遺伝子を10倍以上活性化したことがわかった。クラスタリング解析の結果、認識配列の異なるSAHA-PIPがそれぞれ別々の遺伝子群を発現上昇させたことが明らかとなった。次に遺伝子群の機能解析を行った結果、発現上昇した遺伝子のいくつかは特定の組織に関連することがわかった。これらの遺伝子は通常繊維芽細胞では発現しておらずSAHA-PIPによって活性化することが、定量PCRによって確かめられた。</p> <p>以上よりSAHA-PIPはDNA配列選択性の違いによって異なる遺伝子を発現上昇させることが明らかとなり、細胞の運命制御や疾病治療への応用可能性が示唆された。</p>			
2. A synthetic DNA-binding inhibitor of SOX2 guides human induced pluripotent stem cells to differentiate into mesoderm			
<p>ヒト人工多能性幹細胞 (ヒトiPS細胞) は体を構成する三胚葉 (外胚葉、中胚葉、内胚葉) 全てに分化することのできる細胞である。遺伝子発現パターンの変化により分化誘導が制御されているが、遺伝子発現に直接作用して分化誘導を制御する化合物</p>			

はこれまでに報告されていなかった。そこで申請者は中胚葉誘導の抑制因子として知られるSOX2転写因子に着目し、その下流遺伝子の発現を制御して中胚葉を誘導するPIPの開発を行った。

SOX2が結合するDNA配列を標的とし、2つのPIP (PIP-S1、PIP-S2) を設計・合成した。ゲルシフトアッセイにより、PIP-S2が効果的にSOX2—DNA結合を阻害することが明らかとなった。そこでPIP-S2をヒトiPS細胞に処理したところ、中胚葉のマーカー遺伝子BRACHYURYなどの発現から、PIP-S2がヒトiPS細胞から中胚葉を誘導することが示された。また、PIP-S2処理によって得られた中胚葉にWnt/ β -catenin経路の阻害剤を処理し培養を継続した結果、分化誘導開始12日目に自発収縮を行う心筋細胞を得ることに成功した。

以上のことから、PIP-S2はSOX2下流遺伝子の発現制御により、ヒトiPS細胞から中胚葉を誘導することが示された。PIP-S2は多能性幹細胞の分化誘導を制御する初めてのDNA結合性合成化合物である。PIPの標的配列は変更可能であるため、本研究と同様の戦略により他の細胞系譜の分化誘導への応用も期待される。

3. Targeted acetylation of nucleosomes by introducing artificial histone codes of acetylation at specific DNA sequences

SAHA-PIPによるヒストンアセチル化は、HDAC阻害の結果生じる間接的なものである。より直接的にアセチル化を誘導するにはHATをリクルートすることが必要である。そこで申請者は、細胞内で働くアセチル化修飾の伝播システムを利用することで、P300を標的配列へリクルートする新規化合物の開発を行った。

CBP/P300のブロモドメインへ選択的に結合するブロモドメイン阻害剤とPIPを結合させることでブロモドメイン阻害剤—PIPコンジュゲート (Bi-PIP) を設計、合成した。再構成ヌクレオソームを用いた評価実験により、Bi-PIPは標的ヌクレオソームへP300のリクルートすることにより配列選択的なアセチル化を促進することが示された。Bi-PIPは任意のDNA配列へ配置可能な「人工ヒストンコード」と捉えることができ、人為的なエピジェネティック制御への応用が期待される。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

塩基配列選択的にDNAへ結合するピロール-イミダゾールポリアミド(PIP)は、特定の遺伝子を発現調節する分子ツールとして中分子医薬への応用が期待されている。本論文で申請者はPIPを基盤とする合成分子による選択的な遺伝子の発現調節、および細胞の運命制御に関する研究を行った。

第1章ではDNAマイクロアレーを用いたゲノムワイドな遺伝子発現解析により32種類のヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤コンジュゲートであるSAHA-PIPライブラリーの評価を行った。その結果、PIPの標的配列の違いによって異なる遺伝子群が活性化することが示された。

第2章では、PIPによるiPS細胞の分化誘導制御を検討した。デザインされたPIP-S2がSOX2のDNAへの配列特異的な結合を効果的に阻害し、中胚葉細胞を効率よく分化誘導することが示された。また、PIP-S2とWnt阻害剤を段階的に処理することにより、中胚葉を経て拍動する心筋細胞を効率よく得ることに成功した。本研究は塩基配列選択的なDNA結合分子を多能性幹細胞の分化誘導に初めて用いた先駆的な研究であり、遺伝子発現を直接標的として細胞の運命をコントロールするコンセプトを示した。

第3章では、ブロモドメイン阻害剤とPIPのコンジュゲート「Bi-PIP」を設計・合成し、ブロモドメインを介したP300のリクルートによるヒストンアセチル化を検討した。再構成ヌクレオソームを用いた実験により、標的配列を有するヌクレオソームが選択的にアセチル化されることを示した。細胞内で働いているアセチル化修飾の伝播メカニズムを利用した機構が独創的である。また、Bi-PIPによるヒストンアセチル化の分子メカニズムがIn vitro再構成系での実験により証明されたという点においても価値が高い。

以上、本論文は、DNA結合性化合物PIPを基盤とする新規化合物を開発し、これを用いて配列選択的な遺伝子発現制御および細胞の運命制御を達成した。この研究はPIPを利用した医薬品の開発や遺伝子発現制御機構の研究のためのツールとしての応用に貢献すると考えられる。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成30年1月16日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った。その結果、合格と認められた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降